

Germinación *in vitro* y callogénesis de *Mammillaria huitzilopochtli* D.R. Hunt.

J. A. García-Pérez¹, B. López Isabel¹, J. F. Ortega Ortiz¹, T. F. Carmona Valdovinos¹, B.L. Náder García¹

Universidad Veracruzana, Facultad de Biología, Circuito Gonzalo Aguirre Beltrán s/n, Zona Universitaria, C.P.91090, Xalapa, Veracruz, México

* garc95@hotmail.com

Área de participación: Ingeniería química

Resumen

Las especies del género *Mammillaria* son las más numerosas dentro de la familia Cactaceae, y algunas de ellas están amenazadas como resultado de actividades humanas, tal es el caso de *Mammillaria huitzilopochtli*. El cultivo *in vitro* es una alternativa para la recuperación de las poblaciones de estas especies. En este trabajo se desarrolló un protocolo para la germinación a partir de semillas y generación por callogenesis de *M. huitzilopochtli*. Se realizaron barridos hormonales para: i) determinar la concentración óptima de ácido indol acético (AIA) para el desarrollo y alargamiento de brotes, y, ii) establecer la concentración óptima de AIA y de bencil amino purina (BAP) para la inducción y proliferación de callo para realizar la cinética de crecimiento

Palabras clave: Germinación, callogenesis, reguladores de crecimiento, embriogenesis

Abstract

The *Mammillaria* species are the most numerous within the Cactacea family and some of them are threatened with extinction as a result of human activities, such as *Mammillaria huitzilopochtli*. In vitro culture is an alternative for recovery and studies of secondary metabolites among others. In this work we developed a protocol for germination of seeds and callus generation of *M. huitzilopochtli*. The aims were: i) Establish by hormonal sweeps the optimal concentrations of indole acetic acid (AIA) for the development of outbreaks, and, ii) Identify the optimal concentration of AIA and benzyl amino purine (BAP) for the induction and proliferation of callus in order to develop the growth kinetics.

Key words: Germination, callogenesis, growth of regulators, embryogenesis

Introducción

La propagación masiva de *Mammillaria huitzilopochtli* puede hacerse mediante cultivo de tejidos, a través del proceso de callogenesis donde es posible obtener tejido indiferenciado partiendo de algún ex plante, tal como semillas, hojas u otros órganos de la planta. Este cúmulo de células indiferenciadas o callo, al tener la propiedad de la totipotencialidad celular, puede ser mantenido *in vitro* para usarse como un intermediario en la generación de brotes y, posteriormente, obtener plantas completas mediante embriogenesis somática indirecta estimulada a través del uso y combinación de reguladores de crecimiento (RC) tales como las auxinas y cito quininas [Rodríguez Beraud y col., 2014]. *M. huitzilopochtli* es una cactácea de distribución muy limitada, que se encuentra en peligro de extinción [NOM-059-ECOL.2001, 2002], ya que existen sólo cuatro poblaciones establecidas en una área de 1058 ha en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán [Peters y Martorell, 2001] y existe una gran presión sobre estas por parte de coleccionistas y con propósitos comerciales [Hernández y Godínez, 1994; Rodríguez-Peraza y col., 2015]. En general, la germinación natural de semillas en cactáceas es, con frecuencia, un proceso difícil debido al medio en el que se desarrollan, ya que aun cuando producen numerosas semillas, solamente unas pocas alcanzan a germinar [Bravo y Sánchez, 1995; CONABIO, 1997], y *M. huitzilopochtli* presenta esta característica. Por esta razón, esta especie es una candidata ideal para el cultivo *in vitro* con el

propósito de obtener individuos sanos con fines de repoblación o comercialización. Pocos estudios específicos se han realizado para evaluar el efecto de reguladores de crecimiento en la formación de callo en cactáceas, sin embargo, para algunas especies diferentes del género *Mammillaria*, se determinó que el mejor fitorregulador para la inducción de callo de *Hilocereus undatus* y *Cereus peruvianus* fue el 2,4 D en medio MS a razón de 4.0 mgL^{-1} [Karimi y col., 2010; Lopes, y col., 2016]. Para especies del género *Mammillaria* (e.g. *M. carmenae*), también se ha utilizado el regulador 2,4 D en medio MS, sin embargo, este se usó a razón de 2 mgL^{-1} suplementado con 0.5 mgL^{-1} de bencil adenina (BA) [Coca-Soriano y col., 2007]; y a razón de $18 \mu\text{M}$ de 2,4 D más $9.3 \mu\text{M}$ de cinetina para el caso de *M. plumosa* [Téllez-Román y col., 2017]. Otros reguladores han sido usados para generar tejido calloso en especies del género *Turbinicarpus* así como para *Echinocereus cinerascens*, en los que se utilizaron BAP, y BAP más ANA respectivamente [De la Rosa-Carrillo y col., 2012; Elías y col., 2014]. Sin embargo, no se encontraron estudios donde se haya utilizado la auxina natural Ácido Indol Acético (AIA) para la formación de callo. Estudios adicionales en cactáceas con reguladores de crecimiento se han probado en la germinación de semillas; por ejemplo, la germinación de *Obregonia denegrii* Frič se incrementó hasta en 85% al remojarlas en $1.4 \mu\text{M}$ de ácido giberélico (GA) comparado con el control (22%) [Cardarelli, y col., 2010], aunque en otros trabajos con semillas de *Mammillaria schiedeana schiedeana* y *Escobaria cubensis* el medio MS $\frac{1}{2}$ fue suficiente para obtener entre 71 y 96% de germinación respectivamente [Soria-Campos y col., 2013; Rodríguez De Francisco y col., 2013]. Igualmente, en estos últimos estudios una combinación BA/ANA fue utilizada para la inducción de brotes. En el primer estudio, la combinación $1/0.1 \text{ mgL}^{-1}$ de BA/ANA dio el mejor promedio de brotes por explante (22.4) usando brotes regenerados *in vitro*, mientras que la combinación $0.5/0.1 \text{ mgL}^{-1}$ dio el mejor promedio de brotes (6.5) a partir de explantes derivados de plántulas; en tanto que para el segundo estudio el mejor promedio de brotes por explante (5.1) se dio con la combinación $13.3 \mu\text{M}/5.4 \mu\text{M}$ de BA/ANA, logrando, además, un promedio de 2.5 raíces por planta en medio MS suplementado con $8.1 \mu\text{M}/2.5 \mu\text{M}$ de ANA/ ácido indolbutírico (ABI). Una combinación adicional de BAP/AIA en medio MS, a razón de $2.2 \mu\text{M}/0.57 \mu\text{M}$ fue el mejor para inducir la formación de brotes de *Opuntia stricta* mediante activación de areolas [Medeiros y col., 2017]. Partiendo de estos antecedentes consideramos que se dispone de suficiente información para el desarrollo de un protocolo eficiente para la producción de callo y desarrollo de plántulas de *M. huitzilopochtli in vitro*. El objetivo fue determinar la mejor concentración de AIA y de BAP, para la elongación de plántulas y callogénesis de *M. huitzilopochtli*

Materiales y Métodos

Colecta del material biológico

Mammillaria huitzilopochtli fue colectada en 2009 por el Biólogo David Jimeno-Sevilla en el municipio Cuicatlan, en pendientes del Río Grande, en Oaxaca, (No. de registro 1259). Una segunda colecta se realizó en febrero 2010, y las plantas fueron mantenidas durante un mes en macetas con 50% de tierra y 50% de tepetzil para esperar la producción de frutos.

Pre-tratamiento de semillas con funguicida

252 semillas obtenidas de cinco frutos fueron lavadas con solución jabonosa y agua corriente, posteriormente fueron colocadas en solución fungicida (Extran 1 mg/L^{-1}) por 30 min en agitación constante, y lavadas primero con agua corriente y luego con agua des ionizada estéril. Dentro de la campana de flujo laminar, las semillas se sumergieron en solución de hipoclorito de sodio (Cloralex®, Alen) al 40% adicionando tres gotas de bactericida (microdyn) y una gota de tween 20 por cada 50 ml de solución durante diez minutos en agitación constante. Finalmente se lavaron tres veces con agua des ionizada estéril por cinco minutos.

Siembra y germinación de semillas

Para la germinación de semillas se utilizó el Medio de cultivo Murashige y Skoog [1962] (MS) complementado con 30 g/L^{-1} de sacarosa, 4 g/L^{-1} de Fitagel, y 2.0 mg/L^{-1} de Adenina sulfatada (AS). El pH se ajustó a 5.7 ± 0.1 usando HCL 1N/ NaOH 1N. Finalmente 20 ml de medio de cultivo fueron colocados en cada uno de 21 frascos gerber® que fueron previamente esterilizados en

autoclave a 121° y 1.2 kg/cm^2 de presión durante 18 minutos. Las semillas se inocularon a razón de tres semillas por frasco (63 semillas en total) y transferidas inmediatamente a la cámara de incubación donde se mantuvieron con iluminación blanca (fotoperiodo 24 h luz) a temperatura constante de $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$, y humedad relativa entre 80 a 90%. La aparición de radícula y tallo en las semillas de *M. huitzilopochtli* fueron los referentes de la germinación. El desarrollo y crecimiento del tallo (mm) de las plántulas se registró cada semana. Las semillas restantes (189) fueron mantenidas por dos semanas en oscuridad constante para repetir el proceso de siembra a intervalos de una semana. En total se realizaron cuatro siembras con un lote de 63 semillas cada una.

Alargamiento de plántulas por corrimiento hormonal

Plántulas de aproximadamente 5 cm de alto fueron sometidas a un nuevo cultivo en medio MS suplementado con AIA en concentraciones de 0.0, 0.3, 0.6, 0.9 y 1.2 mgL^{-1} . Por cada concentración, 10 repeticiones fueron establecidas con una planta por réplica. La altura de las plántulas fue medida cada siete días con regla de papel milimétrico. Una vez detectada la concentración óptima de AIA para el crecimiento de las plántulas, las plántulas del resto de los tratamientos fueron subcultivadas a la concentración óptima de AIA para incrementar su altura y fueron monitoreadas por seis meses.

Inducción, proliferación y cinética de callogénesis

A partir de plántulas obtenidas por germinación, se obtuvieron aproximadamente 30 fragmentos mediante disección. Los fragmentos fueron sometidos a cinco tratamientos de AIA a concentraciones de 0.0, 0.3, 0.6, 0.9 y 1.2 mgL^{-1} suplementados con 0.6 mgL^{-1} de BAP y 2.0 mgL^{-1} de AS. Cada tratamiento tuvo cinco repeticiones con un fragmento por repetición. Todas las unidades experimentales fueron sometidas a foto período de 8 h luz por 16 h de oscuridad, a temperatura y humedad relativa ya mencionadas, las cuales fueron monitoreadas diariamente hasta la aparición de callo. Para la proliferación de callo, se usaron ocho repeticiones con medio MS suplementado con 0.9 mg/L^{-1} de AIA y 0.6 mgL^{-1} de BAP para buscar la respuesta óptima de masa celular indiferenciada. A cada repetición se le colocó 1 g de callo y este fue pesado durante dos meses cada semana y el incremento en g fue registrado.

Análisis de datos

El porcentaje de germinación se estimó mediante la ecuación propuesta por Arriaga y col. [1994], la altura media de las plántulas y el peso medio de los callos fueron analizadas mediante un Análisis de Varianza (ANAVA) de medidas repetidas y mediante un ANAVA de una sola vía, seguidos de una prueba de Tukey para las comparaciones múltiples [Zar, 1999]. Los análisis de realizaron con el software STATISTICA V7 StatSoft ©Inc. [2007].

Resultados y Discusión

Pretratamiento de semillas

El pre tratamiento de semillas con fungicida resultó en una proporción de contaminación de semillas de sólo el 1.19%, por lo que se considera que el pre tratamiento fue efectivo.

Germinación de semillas *in vitro* y elongación de plántulas

La proporción de semillas germinadas en las cuatro siembras fue de 98.41%, 96.82%, 96.82% y 96.65%, para un promedio de 96.42% de germinación, el cual se considera excelente, y califica al medio MS como un sustrato adecuado para tal fin, contrario a lo reportado por Soria-Campos y col. [2013] quienes obtuvieron un promedio de 76% de germinación *in vitro* de *M. schiedeana* sembrada en medio MS adicionado con 0.5 mgL^{-1} de BA. Por su parte, Cardarelli y col., [2010] obtuvieron un valor máximo de 72.7% de germinación a los 28 días después de la siembra de *Obreorgia denegrii*.

La germinación de *M. huitzilopochtli* inició a los tres días, pero las plántulas se mantuvieron sin crecimiento por lo que fue necesario agregar 0.6 mgL^{-1} de AIA para estimular su alargamiento. Las

plántulas sometidas a esta concentración fueron de color verde claro y a los 3 meses tomaron una coloración verde olivo con areolas en la parte superior. Dichas areolas fueron estructurando el tallo completo conforme pasaron los meses, y cada areola presento un total de entre 5 y 7 espinas.

Elongación de plántulas

El análisis de ANAVA mostró que el tratamiento donde las plántulas fueron sometidas a 0.6 mgL^{-1} de AIA, fue el más exitoso, alcanzando una altura máxima de 15.4 mm ($F=13.2$, $P=0.0$) (Figura 1) comparada con la altura del resto de los tratamientos cuyo efecto no fue significativo ($P>0.05$). Aunque Montiel-Frausto y col. [2016] reportaron el empleo de AIA con un bajo rendimiento en la elongación de *Hylocereus monacanthus*, obtuvieron la mayor elongación en sus plántulas (22 mm) al suplementar el medio con 1 mgL^{-1} de BAP. Zambrano-Forero y col. [2015] obtuvieron algo similar e indicaron que el uso de BAP (0.5 mgL^{-1}) en *H. monacanthus* fue un mejor regulador en la elongación con respecto al uso de AIA.

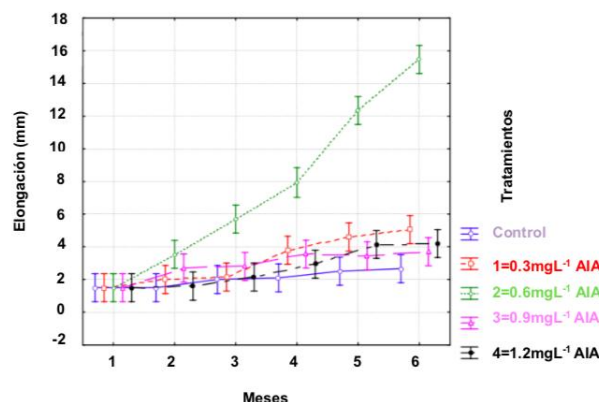


Figura 1. Elongación de plántulas de *M. huitzilopochtli* durante seis meses de cultivo en cinco tratamientos de AIA. Los valores son Media $\pm$ Error estándar.

Una vez determinada la concentración óptima para el alargamiento de plántulas (i.e., 0.6 mgL^{-1} de AIA), esta se aplicó a todas las plántulas sin reguladores producto de las cuatro siembras, y esto se realizó a partir del segundo mes, cuyo resultado puede apreciarse en la Figura 2.

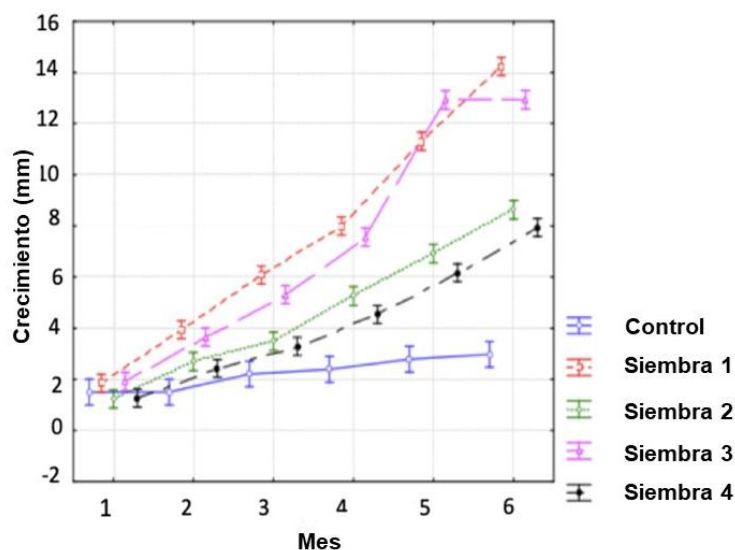


Figura 2. Crecimiento de plántulas de *M. huitzilopochtli* durante seis meses de cultivo para las cuatro siembras efectuadas bajo la aplicación de 0.6 mg/L de AIA. Los valores son Media $\pm$ Error estándar.

El alargamiento de las plántulas en las cuatro siembras mostró diferencias durante el tiempo de monitoreo lo cual se aprecia claramente en la curva de crecimiento. La siembra 1 y 3 mostraron un alargamiento de 15.4 y 13.7 mm respectivamente, muy por encima del resto de las siembras, incluyendo al control, el cual fue el tratamiento con una menor respuesta de crecimiento. El análisis estadístico corroboró que el tiempo de siembra y el tiempo de almacenaje de las semillas, posiblemente influyeron en las diferencias en el alargamiento de las plántulas. La elongación de las plántulas tratadas genéricamente con AIA a concentración de 0.6mgL^{-1} , difirieron notablemente de aquella obtenida con plántulas sometidas a AIA en concentraciones de 0.3, 0.9 y 1.2mgL^{-1} (Tabla 1).

Tabla 1. Registro de promedios en longitud por tratamiento durante cada mes (los valores son promedio $\pm$ error estándar)

	Mes 2	Mes 3	Mes 4	Mes 5	Mes 6
	Promedio	Promedio	Promedio	Promedio	Promedio
Total	2.24 ± 1.12	2.92 ± 1.72	3.98 ± 2.53	5.27 ± 3.91	6.02 ± 4.91
Control	1.50 ± 0.00	2.00 ± 0.00	2.10 ± 1.12	2.51 ± 1.76	2.66 ± 1.91
0.3mg/L	2.00 ± 0.87	2.15 ± 0.78	3.79 ± 1.66	4.60 ± 1.98	5.05 ± 1.92
0.6mg/L	3.54 ± 0.87	5.77 ± 1.09	7.94 ± 1.47	12.33 ± 2.15	15.41 ± 1.78
0.9mg/L	2.70 ± 0.48	2.80 ± 0.42	3.55 ± 0.44	3.45 ± 1.23	3.70 ± 1.36
1.2mg/L	1.60 ± 1.43	2.15 ± 1.85	2.94 ± 2.64	4.15 ± 2.25	4.20 ± 2.25

Inducción, proliferación y cinética de callogénesis

El medio MS suplementado con AS a concentración de 0.9mgL^{-1} AIA y 0.6mgL^{-1} BAP resultó ser el más efectivo con la mayor producción de callo. Esto difirió de lo obtenido por Robles-Martínez y col., [2016] quienes reportaron la formación de 70% total de la inducción de callo en *Opuntia streptacantha* y el 100% en *O. megacantha* y de *O. ficus* en 15 días a partir de su cultivo empleando 3mgL^{-1} 2,4-D y 0.5mgL^{-1} BA. Además, Rodríguez Beraud y col. [2014] reportaron una producción alta de callos en ex plantas de hipocótilos de *Ugni molinae* con 1,0 y 5.0mgL^{-1} de ANA, confirmando así la variabilidad de respuestas a los reguladores de crecimiento, en de las especies trabajadas.

Los ex plantas de este estudio colocados en medio basal sin hormonas presentaron formación de callo únicamente en una de las repeticiones. El callo producido en el primer experimento disminuyó su producción a las dos semanas de cultivo y fue necesario sub-cultivarlos usando $0.9\text{mgL}^{-1}/0.9\text{mgL}^{-1}$ de AIA/BAP. Después de una semana el tejido calloso incrementó su biomasa, indicando mejores condiciones del medio de cultivo. La coloración del tejido calloso de *M. huitzilopochtli* en los primeros días de cultivo fue verde limón con tonalidades rojo intenso y la coloración cambió de intensidad conforme los días transcurrieron. Estos resultados fueron diferentes a los presentados en la callogénesis de *Opuntia joconostle* donde su callo mostró diferentes tonalidades (verde, café y blanco) con aspecto friable [Rodríguez-Peraza y col., 2015]. La mezcla de tonalidades en nuestro estudio se hizo uniforme a las tres semanas de cultivo y se mantuvo así hasta el resto de las semanas. En este punto coincidimos con De la Rosa-Carrillo y col., [2012] quienes reportaron una alta producción de pigmentos (betalainas) en la masa celular de *Turbinicarpus valdezianus* var. *Albiflorus*, confirmando así lo establecido por Santos-Díaz y col., [2005] quienes mencionan al género *Mammillaria* como generadores de callos productores de betaxantinas. Prácticamente en ningún otro estudio con cactáceas se había reportado el uso de la auxina natural AIA para la inducción de callo, y se ha reportado el uso de otras auxinas sintéticas tales como el 2, 4 D. Por tanto, este es otro de los aportes principales de este estudio a partir del cual podrían usarse las concentraciones proporcionales obtenidas de AIA y BAP como de referencia para inducir la formación de callo en otras especies de cactáceas amenazadas.

Cinética de crecimiento

La figura 3 muestra que el incremento semanal de biomasa de tejido calloso en el tratamiento con reguladores (0.9mgL^{-1} de AIA y BAP respectivamente) fue superior al incremento de la biomasa en el tratamiento sin reguladores. Se observó que durante las tres primeras semanas no se presentaron diferencias significativas cuando se aplican o no los reguladores, sin embargo, a partir

de la cuarta semana las diferencias se hicieron manifiestas, disparándose el aumento de biomasa con el tratamiento con reguladores, el cual alcanzó en la octava semana un promedio de 12.5 gr. Ávila y col., [2005] destacaron el aumento de callo cuando los cultivos estuvieron bajo el efecto de 5mgL^{-1} de 6- γ , γ -dimetilalilaminopurina (2iP) logrando la formación de callo embriogénico cuando los ex plantas fueron repicados en medio libre de reguladores. Por otro lado, Ramos-Parra y col., [2010] obtuvieron un promedio de 5.5g de callo de *Strombocactus disciformis* empleando medio MS y MS $\frac{1}{2}$ más 2.5mgL^{-1} y 3mgL^{-1} de 2,4 D en un periodo de un mes posterior a su siembra.

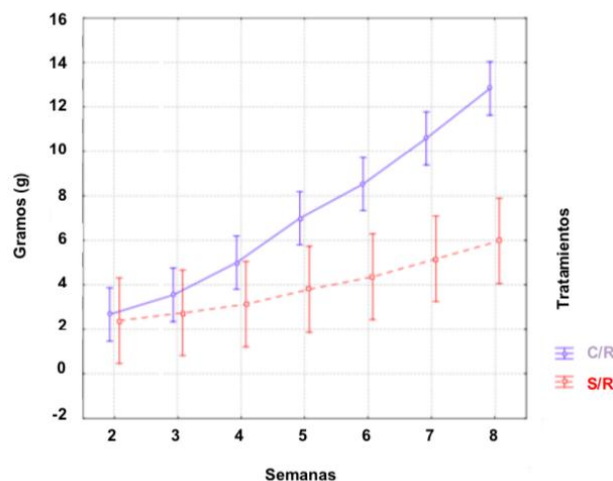


Figura 3. Cinética de crecimiento de tejido calloso en medio MS suplementado con reguladores (C/R) (0.9mgL^{-1} AIA y 0.9mgL^{-1} de BAP), y el tratamiento control (S/R)

Conclusiones

La germinación de *M. huitzilopchtli* y la formación de raíz se produjo sin necesidad de adicionar reguladores de crecimiento al medio MS suplementado con 3% sacarosa, obteniéndose con esto un promedio de germinación del 96.42%. El alargamiento de plántulas requirió de estimulación mediante la adición de una concentración mínima de AIA (0.6mgL^{-1}). La inducción y la proliferación de tejido indiferenciado o callo de *M. huitzilopochtli* se optimizó adicionando al medio 0.9mgL^{-1} AIA y 0.6mgL^{-1} BAP, lográndose callo friable de color verde claro y pigmentación rojiza lo que permitió especular sobre la producción de cantidades de metabolitos secundarios. Este es uno de los primeros reportes donde se muestra la efectividad de la auxina natural AIA para la estimulación de la formación de callo en cactáceas pero particularmente en *M. huitzilopochtli*. Se concluye que la propagación *in vitro* de *M. huitzilopochtli*, es factible a partir de los reguladores de crecimiento empleados en este estudio, lo que coadyuvaría a salvaguardar las poblaciones de la especie en su ambiente natural.

Referencias

1. Arriaga, V. Cervantes V. y Vargas-Mena, A. (1994). Manual de Especies Nativa. SEDESOL. Instituto Nacional de Ecología, Red para el Desarrollo Sustentable, A.C. UNAM.Mexico.
2. Ávila, J. F., Alberico, F., Buendía, L., Orozco, J., Lechuga, J. A. y Cruz, F. (2005) Reporte preliminar sobre micropropagación de *Obregonia denegrii*, CACTÁCEA en peligro de extinción. XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.
3. Barba, A. (1999). Reguladores de crecimiento Vegetal en cultivo de Tejidos Vegetales, Trilla. compounds production. *African Journal of Biotechnology* 12 (21): 3204-3207.
4. Bravo-Sánchez H. (1995). Los cactus y otras suculentas. Tercera edición. Mexico Universidad de Autónoma de México, UNAM. Direccion general de publicaciones. Vol. 1. 142 pp.

5. Cardarelli, M., Borgognone, D. y Colla, G. (2010). *in vitro* propagation of *Obregonia denegrii* Frič. (cactaceae). *Propagation of Ornamental Plants* 10 (1): 29-36.
6. Coca-Soriano, E., Ortiz-Montiel, G., Sánchez-Correa, S. y Pérez-Crisanto, P. (2007) Efecto de la irradiación luminosa en la aclimatización de *Mammillaria carmenae* Castañeda (Cactaceae) proveniente de cultivo *in vitro*. *Cactaceas y Suculentas Mexicanas* 52 (2): 100-108.
7. CONABIO, (1997). La diversidad biológica de México: Estudio de país, Comisión Nacional para el conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. pp 341.
8. De la Rosa-Carrillo, M. L., Domínguez-Rosales, M. S., Pérez-Reyes, M. E. y Pérez Molphe-Balch, E. (2012) Cultivo y propagación *in vitro* de cactáceas amenazadas del género *Turbinicarpus*. *Interciencia* 37 (2): 114-120.
9. Elías, H., Taha, R. M., Hasbullah, N., Mohamed, M., Abdul, M. A., Noraini, M., Mohajer, S. (2014) The effects of plant growth regulators on shoot formation, regeneration and coloured callus production in *Echinocereus cinerascens in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 120 (2): 729–739.
10. Hernández, H. y Godínez, H. (1994). Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. *Acta Botánica Mexicana* 26: 33-52.
11. Hill, T. y Lewicki, P. (2007). Statistics: Methods and Applications. Statsoft, Tulsa, ok. <http://www.jofamericanscience.org>. <http://www.statsoft.com/textbook/> (Printed version)
12. Karimi, N., Mofid, M. R. E., Ebrahimi, M., Naderi, R. (2010) Effect of areole and culture medium on callus induction and regeneration *Cereus peruvianus* Mill (Cactaceae). *Trakia Journal of sciences* 8 (2): 31–35.
13. Lopes-Camila, A., De Maria Gomes Dias, G., Salles-Pio, L. A., Da Silveira, F. A., Almendagna-Rodrigues, F., Pasqual, M. (2016). Indução de calos, potencial embriogênico e estabilidade genética em pitaiá vermelha Agrária. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias* 11 (1): 21-25.
14. Medeiros de Araújo, M. S. y De Souza, L. M. (2017). Response of *Opuntia stricta* Haw micropropagated plants in acclimatization and field. *Bioteecnología Vegetal* 17 (2): 91 – 97.
15. Montiel-Frausto, L. B., Enríquez del Valle, J. R. y Cisneros, A. (2016) Propagación *in vitro* de *Hylocereus monacanthus* (Lem.) Britton y Rose. *Bioteecnología Vegetal* 16 (2): 113– 123.
16. Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* 15: 473-497.
17. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial. (30 de diciembre de 2010). México, D. F.
18. Pérez-Molphe-Balch, E., Santos-Díaz, M. S., Ramírez-Malagón, R., Ochoa-Alejo N. (2015) Tissue culture of ornamental cacti. *Sci. Agric.* 72 (6): 540-561.
19. Peters-Recagno, E. y Martorell, C. (2001). Conocimiento y conservación de las mamilarias endémicas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Universidad Nacional Autónoma de México Instituto de Ecología. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. R166. México D.F.
20. Ramos-Parra, M., Ulín-Montejo, F., Aguilar-Nieto, J. A., Solís-Trápala, I. L. y Fierro-Carbajal, J. B. (2010) Modelación y estimación del volumen de tejido vegetal *in vitro* de *Strombocactus disciformis* basada en mediciones no intrusivas. *Universidad y Ciencia. Trópico Húmedo* 26 (2): 195-203.
21. Robles-Martínez, M., Barba-de la Rosa, A. P., Gueraud, F., Negre-Salvayre, A., Rossignol, M. y Santos-Díaz, M. A. (2016). Establishment of callus and cell suspensions of wild and domesticated *Opuntia* species: study on their potential as a source of metabolite production. *Plant Cell Tiss Organ* 124: 181- 189.
22. Rodríguez De Francisco, E., Daquinta, M. A. y Fernet-Hernández, E. (2013). Propagation *in vitro* of *Escobaria cubensis* (Britton & Rose) Hunts. *Ciencia y Sociedad* 38 (2): 345-375.
23. Rodríguez-Beraud, M. M., Latsague-Vidal, M. I., Chacón-Fuentes, M. A. y Astorga-Brevis, P. K. (2014) *In vitro* induction of callogenesis and indirect organogenesis from explants of cotyledon, hypocotyl and leaf in *Ugnimolinae*. *Bosque* 35 (1): 111-118.
24. Rodríguez-Peraza, D. F., Espíritu-Rodríguez, M. M., García-Montoya, J. J., Portillo, L. y Soltero, R. (2015). Cultivos celulares para la regeneración inicial en *Opuntia spp.* *Bol. Nakari* 26(1): 1-4.

25. Santos-Díaz, M. S., Velásquez-García, Y. y González-Chávez M. M. (2005) Producción de pigmentos por callos de *Mammillaria candida* SCHEIDWEILER (CACTACEAE). *Agrociencia* 39: 619-626.
26. Soria-Campos, D., López-Escamilla, A. L., y Olguín-Santos, L. P. (2013) Propagación *in vitro* de *Mammillaria schiedeana schiedeana* (Cactaceae), subespecie endémica y amenazada de extinción de la Barranca de Metztitlán, Hidalgo *Estudios científicos en el estado de Hidalgo y zonas aledañas, Volumen II*, editores Griselda Pulido-Flores y Scott Monks (Lincoln, NE: Zea Books, 2013).
27. Téllez-Román, J., López-Peralta, M. C. G., Hernández-Meneses, E., Estrada-Luna, A. A., Araceli Zavaleta-Mancera, H. y Livera-Muñoz, M. (2017) Morfogénesis *in vitro* de *Mammillaria plumosa* Weber. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 8 (4): 863-876.
28. Zambrano-Forerol, C. J., Ríos-Osoriol, J. A., Beltrán-Pedrozal, D. M. y Mesa-López, N. (2015) Evaluación de reguladores de crecimiento en la propagación *in vitro* de *Hylocereus megalanthus* (pitahaya amarilla). *Revista Tumbaga* 1 (10): 76-87.
29. Zar, J. H. 1999. Biostatistical analysis. Prentice Hall. Upper Saddle River, NJ, USA.